Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUFLÖSUNG DER SOMITEN BEI RATTENEMBRYONEN (Tag 9+2 bis 12+2)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Faber
aus Gleiwitz

1972

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUFLÖSUNG DER SOMITEN BEI RATTENEMBRYONEN (Tag 9+2 bis 12+2)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Faber
aus Gleiwitz

Referent : Professor Dr.med. Hans-Joachim M e r k e r

Korreferent : Professor Dr.med. Willi S c h w a r z

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : [redacted] 1972

UNIV. LEIDEN BIBL.

EINLEITUNG 1

METHODEN 9

BEFUNDE 11

DISKUSSION 18

ZUSAMMENFASSUNG 27

LITERATURVERZEICHNIS

BILDMATERIAL

E I N L E I T U N G

Der Säugetierorganismus durchläuft zahlreiche Entwicklungsstadien, von denen dasjenige, was der "Gastrulation" bei Amphibien entspricht, für die weiteren Differenzierungsvorgänge besonders wichtig ist. Es handelt sich um die Phase, in der über den Primitivknoten Zellmaterial zwischen die Keimblätter einströmt (STARCK, 1965; LANGMAN, 1970; CLARA, 1966).

Nach Abschluß dieser "Gastrulation" beginnt die Ausbildung der Primitivorgane. Ihre Entwicklung verläuft bei den einzelnen Säugetieren unterschiedlich.

Bei der Ratte findet man am 9. bis 10. Tag nach Konzeption das Neuralrohr, die Ursegmente (Somiten), Ursegmentstiele, Seitenplatten, den Urdarm und die Allantois.

Von diesen vielfältigen Problemen der Primitivorganbildung erscheint das Studium der primitiven mesodermalen Strukturen insofern interessant, da sie auf Grund ihrer Multipotenz eine sehr große Differenzierungsbreite oder prospektive Potenz zeigen. Bereits im lichtmikroskopischen Bereich

ändern sie ihr morphologisches Bild deutlich während sehr kurzer Zeitspannen.

Die Arbeit soll am Beispiel des Somitenzerfalles und der Myotomentstehung verfolgen, wie der Differenzierungsprozeß bis hin zu den Mesenchymzellen und frühen Muskelzellen im morphologischen Bereich erfolgt. Besonders interessant wäre die Beantwortung der Frage, ob elektronenmikroskopisch-cytologische Kriterien erarbeitet werden können, die eine Einteilung und Beurteilung solcher Vorgänge erlauben.

Unsere Vorstellung von Somitenentstehung, Struktur und Auflösung beruhen großenteils auf lichtmikroskopischen Untersuchungen von Amphibien, Reptilien und Hühnchen. Beim Säugetier sind die Verhältnisse sehr viel weniger untersucht worden. Die vergleichbare Entwicklung bei Maus und Ratte ist beschrieben worden in Arbeiten von:

SOBOTTA, 1903, 1911; SNELL, 1941; GRUNEBERG, 1943; OTIS/BRENT, 1950; REINIUS, 1965; BUTCHER, 1929.

Wenn auch die frühen Differenzierungsvorgänge, die mit der Bildung und Auflösung der Somiten zusammenhängen, bei den einzelnen Säugetieren Unterschiede aufweisen, so scheinen doch vergleichbare Entwicklungsvorgänge vorzuliegen. Die Aufgabe dieser Arbeit wäre es, durch das Studium an der Ratte einen Einblick in das

morphologische Somiten-Verhalten eines typischen Laboratoriumstieres zu erhalten und in Analogieschlüssen eine Übertragung auf den Menschen zu versuchen.

Während der frühen Mesodermentwicklung der Ratte findet man lichtmikroskopisch am 9. Tag, nachdem die Invagination über den Primitivknoten weitgehend beendet ist, seitlich von der Chordaplatte die ungeordneten und dichtgepackten Zellmassen des "Praemesoderms" (BUTCHER, 1929; STARCK, 1965). Diese Zellmasse spaltet sich peripher auf in ein ventrales oder viscerales und dorsales oder splanchnisches Blatt (Visceropleura, Splanchnopleura). Longitudinale Einkerbungen sollen diese sogenannte Seitenplatte vom Somitenmaterial trennen, welches zu diesem Zeitpunkt einen losen, unstrukturierten Zellverband darstellt, der beiderseits säulenförmig parallel zur Chorda verläuft. Dieser dorsal verdickte Mesodermstreifen wird von cranial nach caudal fortschreitend in Somiten zerlegt, welche über Somitenstiele mit den Zellen der Seitenplatte in Verbindung stehen. Diese Segmentierung setzt mit dem Zurückwandern des Primitivknotens ein oder hängt nach Ansicht vieler Autoren mit diesem Vorgang ursächlich zusammen (BALFOUR, 1885; DEXTER, 1891; WILLIAMS, 1910; BUTCHER, 1929; HIRSCH/HAMILTON, 1956; HAMILTON,1969).

Die Ratte besitzt gewöhnlich 65 Somiten. Man unterscheidet 4 occipitale, 8 cervicale, 13 thoracale, 6 lumbale, 4 sacrale und ca. 30 caudale Somiten. In den verschiedenen Regionen unterscheiden die Somiten sich in ihrer Differenzierung dadurch, daß der je nachfolgende Somit bei seinem ersten Erscheinen eine fortgeschrittene Struktur (bezüglich Größe, Zellzahl, Beziehung zur Umgebung) aufweist ("Cranio-caudales Reifungsgefälle" nach WILLIAMS, 1910). Dieses Gefälle führt dazu, daß cranial bereits Somitenauflösungen ablaufen, während caudal noch die Somitenbildung im Gange ist.

Die Somiten oder Ursegmente stellen sich anfangs als dichtgepackter Zellhaufen dar, der sich während und sofort nach der Neurulation zunehmend in einen epithelähnlichen Verband umordnet. Durch Ausrichtung der Zellen nach außen entsteht die typische Rosettenform, in deren Zentrum sich ein Hohlraum, das sogenannte Myocoel, durch das Zusammenfliessen zuvor aufgetretener Spalträume ausbildet (PFEIFFER, 1972). Die bald darauf folgende Obliteration des Myocoels erfolgt, indem Zellen, die aus dem ventralen und ventromedialen Teil der Somitenwand stammen, den Hohlraum ausfüllen (CLARA, 1966).

Die verschiedenen Wandabschnitte der Somiten werden entsprechend ihrer prospektiven Bedeutung als Sklerotom,

Myotom und Dermatom bezeichnet. Die weitere Entwicklung geht mit der Auflösung des epithelialen Zellverbandes einher. Nach Auflösung der Zellkontakte wandern die Somitenzellen der ventro- und ventromedialen Seite, die nun sternförmig verzweigte mesenchymale Gestalt annehmen, durch amöboide Bewegung in die Gebiete ihrer späteren Organanlagen. Schon vor dem Zerfall der ventralen Seite des Ursegmentes verlieren sie ihre Verbindungen zum Ursegmentstiel. Die dorsale Kante dehnt sich dann durch Zellvermehrung in ventraler Richtung aus und nimmt dadurch die Form einer Platte an, dem Myotom.

Die Myotomzellen behalten zunächst ihren epithelialen Charakter. Erst nach Auflösung von Sklerotom und Dermatom in Mesenchym verlängern sie sich und gestalten sich zu Myoblasten um. Sie richten sich in anterior-Posteriore Richtung aus und verschmelzen dann mit den anderen Zellen desselben Somiten. Auf diese Weise entstehen die Myotuben, die sich von einem Ende des Somiten zum anderen strecken.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Laboratoriumstieren über den hier interessierenden Zeitraum liegen noch nicht vor. Die bisher geschilderten Ergebnisse beruhen ausschließlich auf lichtmikroskopischen Arbeiten. Die Differenzierungsrichtung der aus dem mesodermalen Epithelverband freiwerdenden Zellen läßt sich jedoch mit dieser Methode schlecht oder nur sehr spät erfassen.

Das liegt nicht zuletzt daran, daß die Strukturen, die für eine bestimmte Differenzierungsrichtung typisch sind, häufig unterhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes liegen. Ein einzelnes Myofilament z.B. hat einen Durchmesser von nur 60 - 120 Å . Nur das Bündel (Fibrille) aus vielen parallel verlaufenden Myofilamenten wird lichtmikroskopisch sichtbar. Vor der Bildung und damit Darstellbarkeit der Myofilamentbündel läuft aber der komplexe Vorgang ab, der als biochemische Differenzierung bezeichnet werden kann. Die genetische Information muß dabei realisiert werden. Es werden bestimmte Genorte aktiviert, die RNS-Matrizen bilden, an denen differenzierungsspezifisches Protein, z.B. Myosin gebildet wird (BEERMANN, 1963; FLICKINGER, 1962; LOEWENSTEIN, 1966; MERKER, 1964; WESSELLS, 1964). Erst die Anhäufung und bestimmte Anordnung dieses Syntheseproduktes in großen Mengen läßt uns aber die Differenzierung zur Muskelzelle morphologisch klar erkennen.

Hier klafft eine breite Lücke zwischen den molekularen Vorgängen und dem morphologisch faßbaren Substrat. Erst die Einführung der elektronenmikroskopischen Methodik mit höherem Auflösungsvermögen verbesserte die Erfassungsmöglichkeit um ein Vielfaches und verkleinerte die Lücke zwischen "chemischer" und "morphologischer" Differenzierung.

Die Vorgänge im Kern sind zwar auflösungstechnisch darstellbar, aber im Moment noch sehr schwierig zu deuten. Bessere Vorstellungen existieren dagegen von morphologischen Prozessen im Zytoplasma. Hier lassen sich Bildungsort der spezifischen Proteine, die Ribosomen, und ihre Syntheseprodukte, das einzelne Myofilament, deutlich und sicher erfassen.

Mit dieser Technik soll deshalb versucht werden, die Differenzierungsvorgänge, die zwischen Beginn der chemischen Differenzierung und ihrer lichtmikroskopischen Erfassung ablaufen, darzustellen. Diese Befunde könnten dann Grundlage sein für einen Versuch, die morphologische Prägung und den Begriff der prospektiven Potenz und Bedeutung morphologisch zu erfassen.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Somitenauflösung stellen sich zahlreiche Probleme, die noch umstritten oder noch nicht mit entsprechender neuer Methodik bearbeitet sind. Die Untersuchung dieser Probleme an der Ratte erschien uns besonders wichtig, da gerade die Ratte als sehr häufig gebrauchtes Laboratoriumstier zur Testung teratogener oder embryologischer Substanzen bei den bisherigen Untersuchungen etwas vernachlässigt worden ist.

Um zu den angedeuteten Problemen Stellung nehmen zu können und um für eigene entwicklungsphysiologische

und teratologische Untersuchungen Grundlagen zur Verfügung zu haben, untersuchten wir die Somitenauflösung elektronenmikroskopisch. Dabei wurden folgende Probleme besonders berücksichtigt:

1. Das Kontaktverhalten und die Oberflächendynamik der Zellen während der Somitenauflösung.
2. Die cytologischen Veränderungen während dieser Vorgänge bis hin zu den ersten Muskeldifferenzierungen.
3. Das zeitliche Auftreten der verschiedenen cytologischen Merkmale.
4. Die Möglichkeit, die prospektive Potenz morphologisch zu definieren.

M E T H O D E N

Die Embryonen stammen von einem Wistastamm Paderborn FW 68 ab.

Die Tiere wurden bei verschobenem Tag-Nacht-Rhythmus in feuchtigkeits- und temperaturgeregelten Räumen bei Altromin Futter und Wasser ad libidum gehalten.

Nach Vaginalabstrich erfolgt die Verpaarung im Oestrus von 7.30 - 10.30 Uhr. Für die Spermien-positiven Tiere gelten die folgenden 24 Stunden als Tag 0.

Eine weitere Unterteilung gelingt durch Angaben der Stunden, die seit 8 Uhr vergangen sind. 12 Uhr des Tages 0 wurde z.B. mit der Formel 0 + 4 bezeichnet. Die hier berücksichtigten Embryonen entstammen den Tagen: 9 + 2 bis 12 + 2 .

Die Fixierung erfolgte sofort nach Eröffnung der Bauchhöhle und Freilegung der Embryone in toto. Die Fixierungslösung setzte sich zusammen aus einer 3%igen Glutaraldehyd-, 3%igen Paraformaldehyd- und einer 0,1 molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,2). Nach einer Fixierungsdauer von 2 bis 3 Stunden und dem Waschen der Präparate schloß sich die Nachfixierung in 1%iger OSO_4-Lösung an (Phosphatpuffer 0,1 m bei pH 7,2). Nach Entwässerung

der aufsteigenden Acetonreihe erfolgte die Einbettung in Mikropal. Die Schnitte wurden an LKB Ultrotomen hergestellt und mit Uranylacetal/Bleicitrat nachkontrastiert.

Aufnahmen: Siemens-Elmiskope I und Ia bei einer Strahlspannung von 80 KV (Blenden: 200/50 µ).

Voraussetzung für die Orientierung im Einbettungsblock ist die Anfertigung von sogenannten Semi-Dickschnitten (1/2 - 1 µ dick), die nach Färbung mit alkalischer Giemsa-Lösung lichtmikroskopisch gut zu beurteilen sind. Nach diesen Schnitten wurden dann die entsprechenden Stellen ausgewählt, die weiter für die Elektronenmikroskopie mit Ultrotomen geschnitten wurden.

Daneben standen zahlreiche Serienschnitte durch Embryonen bzw. Uteri mit enthaltenen Embryonen zur Verfügung. Dieses Material war in Bouin'scher Lösung fixiert und mit HE bzw. nach der PAS und Azan-Methode gefärbt.

B E F U N D E

Die Entwicklung der Ratte ist durch den außerordentlichen schnellen Verlauf der einzelnen embryonalen Phasen gezeichnet.

Die eigentliche embryonale Entwicklung fängt erst am Tag 8 an. Bis dahin steht das Wachstum der extraembryonalen Teile des Keimes im Vordergrund:
Am Ende des Tages 5 erfolgt die Einbettung. Zu dieser Zeit finden sich nur wenige Zellen innerhalb der Blastocyste, die sich dann später am Aufbau des Embryos beteiligen (Embryoblast). Am Tag 6 und 7 steht das Wachstum des Trophoblasten und des sogenannten Trägers im Vordergrund. Erst am Tag 7 bildet sich an der Spitze des Trägers die Amnionhöhle, deren Boden zum Keimschild wird. Am 8. Tag drängt sich das Mesoderm zwischen die beiden Zellschichten und die Somitenbildung beginnt. Am späten Tag 9 sind dann die ersten Somiten im cranialen Bereich zu erfassen. Die Entstehung immer neuer Somiten schreitet dann caudalwärts fort. Am Tag 12 bilden sich im Schwanzbereich die letzten Somiten, während im cranialen Teil schon ein großer Teil wieder aufgelöst ist.

Dieses Verhalten ermöglicht das Studium der Somitenauflösung in einem relativ großen Zeitraum (Tag 10 und 12), d.h. man ist nicht genau auf eine bestimmte

Zeit zur Untersuchung dieser Vorgänge angewiesen. Im Folgenden soll deshalb die Somitenauflösung elektronenmikroskopisch beschrieben werden, ohne im einzelnen auf den genauen Zeitpunkt, Lage und Nummer des Somiten einzugehen.

Ein voll entwickelter Somit besteht aus einer einschichtigen Lage schlanker, zylindrischer Zellen, die einen runden bis ovalen Hohlraum von einigen µ Durchschnitt umgeben. (Siehe auch die Beschreibung des ausgebildeten Rattensomiten in der Dissertation PFEIFFER, 1971.) Sie sind polar gegliedert. Der Kern sitzt überwiegend basal, d.h. vom Lumen abgewandt. Der größte Teil der Zellarganellen befindet sich lumenwärts. Die Zellmembran verläuft zum Lumen hin relativ unregelmäßig und zeigt ebenso wie die laterale Zellmembran Ein- und Ausstülpungen. Im apicalen Teil der lateralen Kontaktfläche sind die beiden benachbarten Zellen durch besonders strukturierte Haftflächen verbunden, sogenannte Zonulae occludentes. Hier fließen die äußeren Lamellen der doppelt konturierten Zellmembran zusammen. Der extrazelluläre Raum geht dabei verloren. Teilweise nähern sich auch die äußeren Lamellen der Zellmembran an ca. 50 A, ohne sich zu vereinigen ("close contact"). Eine kontinuierliche Basalmembran zum Mesenchym fehlt.

Die ersten Zeichen einer Somitenauflösung lassen sich im medioventralen Bereich erfassen. Die Zellen stülpen sich hier sowohl in das Lumen als auch in das umgebende Mesenchym vor. Gleichzeitig geht durch das Plumperwerden der Zellen die Polarisation verloren. Das bedeutet, daß der Kern dann in der Mitte liegt, die Organellen relativ gleichmäßig verteilt sind und die Abgrenzung zum Mesenchym hin sich verwischt. Die zonulae occludentes lösen sich gleichzeitig auf und die Interzellularlücken werden breiter. Nach diesem Zusammenbruch der epithelialen Anordnung dieses Somitenteils bleibt jedoch noch eine halbmondförmige Epithellamelle bestehen, die mit ihrer Konvexität nach dorsolateral zeigt. Der ursprüngliche Hohlraum ist aber jetzt mit mesenchymähnlichen Zellen angefüllt, die in ihrer lockeren Packungsdichte ungefähr der in der Umgebung entsprechen. Die sogenannten Mesenchym-ähnlichen Zellen weisen zumeist mehrere Fortsätze auf (Reticulum-Zelltyp), die sich an manchen Stellen ohne Ausbildung besonderer Kontakte berühren. Das Cytoplasma enthält neben reichlich freien Ribosomen in Gruppenform (Polysomen) kurze Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums, kleine Mitochondrien vom Crista-Typ, eine Vesikel und Granula und einen kleinen Golgi-Apparat. Einzelne Zellen entwickeln sich bereits in Richtung auf aktive

Fibroblasten, d.h. sie werden plumper und das rauhe ER nimmt zu

Im weiteren Verlauf schmelzen von den Rändern der epithelialen Restfläche, die das Myotom darstellt, weitere Zellen ab, die in ihrem Aussehen ebenfalls den Mesenchymzellen der Umgebung entsprechen. Sie haben vorwiegend eine bipolare, manchmal auch eine trigonale oder sternförmige Gestalt. An der Oberfläche können sie eine wechselnde Zahl unterschiedlich großer Fortsätze tragen, die meistens eine kurze und plumpe Form haben. Der Kern ist groß und vorwiegend rund. Im sonst aufgelockerten Karioplasma heben sich periphere und einige zentrale Chromatinverdichtungen sowie ein großer Nucleolus hervor. Der Nucleolus ist ebenfalls auflelokkert und besteht aus bandartigen Verdichtungen, zwischen denen hellere Räume, sogenannte Vakuolen, liegen. Im Cytoplasma überwiegen die Polysomen, d.h. gruppiert angeordnete freie Ribosomen. Daneben kommen noch einige kurze Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien des Christaetyps mit wenig Matrix und dem kleineren Golgi-Apparat vor.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstehen an den lateralen Enden des verbliebenen Somitenepithelverbandes in zunehmender Zahl Zellen, die auf Grund ihrer morphologischen Kennzeichnung sich als selbständige Gruppe zusammenfassen lassen.

Bei der Verfolgung des weiteren Schicksals dieser Zellart (MERKER,1971 unveröffentlicht) stellt sich heraus, daß es sich hier um die frühesten myogenen Zellen handelt. Es lassen sich alle Übergänge zu den "Myotuben" und späteren quergestreiften Skelettmuskelzellen erfassen. Zunächst aber sind die charakteristischen Merkmale der Muskelzelle, die Myofilamente, noch nicht darzustellen. Diese Zellen sind nur durch ihre Form charakterisiert. Sie zeigen nämlich nicht die typische, d.h. bipolare Form der Mesenchymzellen. Sie sind abgerundet ohne besondere Oberflächendifferenzierung, d.h. ohne Vesikulations- bzw. Endocytosevorgänge und weisen nur wenige plumpe Zellfortsätze auf.

Allein auf Grund dieser morphologischen Zeichen - runde Form mit plumpen Fortsätzen - lassen sich die praesumptiven Muskelzellen von den anderen Zelltypen, die beim Zerfall der Somiten entstehen, trennen.

Die Feinstruktur der Zelle selbst ist außerordentlich gleichförmig und der der übrigen Zellen, die aus den Somiten entstehen, sehr ähnlich. Der große Kern ist meist rund und hat eine vorwiegend glatte Kontur. Nur der dichte und ausgeprägte Nucleolus hebt sich aus dem homogenen übrigen Karyoplasma hervor. Im Cytoplasma überwiegen die freien Ribosomen. Sie sind zu mehreren in Form von Ketten, Kreisen oder Rosetten angeordnet. Es handelt sich also um Polysomen, d.h. mehrere

Ribosomen sind durch einen m-RNS Faden verknüpft. Die übrigen Zellorganellen sind unauffällig. Es kommen einige kleine runde bis ovale Mitochondrien vom Crista-Typ vor, die nur wenig Matrix enthalten. Die Zahl der sehr kurzen Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums ist gering. Auch der Golgi-Apparat ist selten nachweisbar und nimmt einen geringen Raum ein. Kleine elektronendichte Einschlüsse kommen vereinzelt vor.

Bei der weiteren Deutung und Beurteilung der Bilder muß berücksichtigt werden, daß zu diesem Zeitpunkt sich die Blastemanlage des späteren Wirbelsäulenknorpels gerade erst zu differenzieren beginnt. Darüber hinaus lassen sich auch die ersten kleinen Extremitätenknospen nachweisen. Eine Weiterdifferenzierung der von uns beschriebenen myogenen Zellen zu diesem Zeitpunkt ist deshalb nicht zu erwarten und wäre auch wenig sinnvoll. Die Ansatzpunkte der Muskeln am späteren Skelettsystem und damit die Notwendigkeit einer Funktion sind noch längst nicht vorhanden.

Der folgende Tag ist im elektronenmikroskopischen Bild deshalb nicht charakterisiert durch eine weitere Ausdifferenzierung sondern eher durch eine Vermehrung und Wanderung dieser myogenen Zellen. Sie sind jetzt in immer größerer Entfernung von der Myotomlamelle

nachweisbar. Eine kontinuierliche Wanderung solcher Zellen in die Extremitätenknospe ließ sich jedoch niemals nachweisen. Eine Wanderung der beschriebenen myogenen Zellen vom Myotom, das sich inzwischen völlig aufgelöst hat, in die Extremitätenknospe muß auch aus anderen Gründen abgelehnt werden.

In der Peripherie des Körpers und in der Extremitätenknospe tauchen zunächst nur typische Mesenchymzellen auf, die sich über ein typisches Blastemstadium erst sekundär wieder in myogene Zellen umwandeln.

Dagegen lassen sich aber direkte Übergänge zwischen diesem Zelltyp und der Rückenmuskulatur nachweisen, da hier die Notwendigkeit einer Wanderung über längere Strecken und die Formung eines Blastems entfällt.

Die eigentliche Differenzierung in Myoblasten, die sich nach unserer Definition durch einen Gehalt an Myofilamenten auszeichnet, tritt erst relativ spät ein - offenbar ist diese Entwicklung abhängig von der Reifung des Wirbelsäulensytems -. Diese folgende Entwicklung soll deshalb hier nicht weiter beschrieben werden.

D I S K U S S I O N

Der voll ausgebildete Somit besteht aus epithelial aufgebautem mesodermalem Gewebe, deren polarisierte Zellen einen wenig charakteristischen Aufbau der cytoplasmatischen Feinstruktur zeigen. Sie enthalten vorwiegend zu Polysomen gruppiert freie Ribosomen, ein typisches Merkmal der embryonalen Zellen. Nach den bisher erarbeiteten biochemischen und morphologischen Vorstellungen muß angenommen werden, daß an dieser Form der Ribosomen vorwiegend diejenigen Proteine synthetisieren, die in der Zelle selbst verbleiben, also Baustein- und Enzymeiweiß (BIRBECK and MERCER, 1961; MERKER, 1964, 1971). Man findet sie daher in großer Zahl sowohl in den Zellen, die sich schnell teilen (z.B. in embryonalen und malignen Zellen), als auch in sich differenzierenden Zellen, die dabei große Mengen spezifischer Proteine bilden (z.B. Myosin und Keratin).

Das allgemeine elektronenmikroskopische Bild der Polysomen läßt aber leider keine Rückschlüsse auf die Art der gebildeten Syntheseprodukte zu. Die jeweilige Matrize entzieht sich noch völlig der elektronenmikroskopischen Darstellbarkeit. Aus der Morphologie der Somitenzelle ist anhand der Ribosomenstruktur deshalb nicht zu entscheiden, ob diese Zellen ribosomenreich

sind, weil sie eine hohe Proliferationsrate aufweisen, oder ob sie bereits mit der Synthese von spezifischen Makromolekülen begonnen haben. Elektronenmikroskopisch läßt sich nur auf die Quantität dieser Vorgänge nicht aber auf die Qualität schließen. Die Quantität kann abgeschätzt werden

1. aus der Zahl der Ribosomen überhaupt,
2. aus der Zahl der Ribosomen, die einen Polysomen aufbauen.

Der Punkt 2. scheint zur Beurteilung dieser Vorgänge besonders wichtig zu sein. Die Information eines einzelnen m-RNS Fadens kann zweifellos mehrmals hintereinander abgelesen werden. (DANON, 1969). Je mehr Ribosomen sich zum Zeitpunkt der Fixation mit dieser Aufgabe beschäftigen, umso größer ist ihre einen Polysomen aufbauende Zahl.

Auf dieser morphologischen Grundlage ist es also unmöglich zu entscheiden, ob die noch im Somiten- bzw. Myotomverband verankerten Zellen bereits ihre Differenzierung begonnen haben.

Ein Differenzierungszeichen stellt dagegen in anderen epithelialen Zellverbänden die Polarisierung dar. Damit ist eine bestimmte Oberflächenstrukturierung an der apikalen Seite und eine typische Verteilung der Zellorganellen verbunden. Die Polarisierung kann aber hier

nicht als Differenzierungsmerkmal betrachtet werden, da beim Lösen aus dem Myotomverband diese Formeigenschaft sofort wieder verloren geht. Man ist also höchstens berechtigt, von einer "Modulation" oder "Transformation" zu sprechen (MASSHOFF, 1955; weitere Lit. siehe MERKER, 1964).

Interessant aber ist in diesem Zusammenhang, daß eine Polarisierung auch eintritt ohne Vorhandensein einer Basalmembran. In vielen einschichtigen Epithelverbänden wird häufig der Einfluß der Basalmembran auf Polarisierung und Differenzierung unterstellt (MERKER, 1969; v.BRUCHHAUSEN und MERKER, 1965).

Wie unser Beispiel des Somiten zeigt, ist nicht für alle Polarisierung diese bindegewebige Verdichtungszone notwendig. Eher erscheinen die Milieuunterschiede zwischen Hohlraum und Mesenchym ein ausschlaggebender Faktor zu sein. Man muß davon ausgehen, daß die Zellen im apikalen Bereich durch zonulae occludentes verknüpft sind. An diesen Zellen geht also der Interzellularraum auf einer kurzen Strecke durch Verschmelzung der äußeren Lamellen der Zellmembran verloren. Das bedeutet aber, daß der Stoffaustausch zwischen Innenraum des Somiten und mesenchymalem Interzellularraum nur zellulär kontrolliert wird (BENEDETTI and EMMELOTT, 1968; FARQUHAR and PALADE, 1963; LOEWENSTEIN, 1966; REVELand KARNOVSKY; 1967;

Mc NUTT and WEINSTEIN, 1970; SCHÜSSLER, 1971; SHERIDAN, 1966). Dadurch entstehen aber zweifellos Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen diesen beiden Compartments, die eine Polarisierung prägen könnten.

Das Fehlen der Basalmembran um die Somiten oder um das Myotom ist anderseits durchaus verständlich. Die Aufgabe dieser epithelähnlichen, mesodermalen Zellverbände beruht ja gerade auf einer Produktion und Freisetzung von Zellen. Die Proliferations- und Bewegungsdynamik ist deshalb an dieser Stelle des jungen Embryos auch außerordentlich hoch. Diese Vorgänge würden aber durch eine Basalmembran gestört werden, die in Analogie zu ihrem Verhalten in anderen Organen über eine stabile Eigenschaft verfügen muß (v.BRUCHHAUSEN und MERKER, 1965; VOLLRATH, 1966).

Die Fähigkeit zur Basalmembranbildung ist aber zu diesem Zeitpunkt in den embryonalen Geweben bereits möglich. So findet man unterhalb des Ektoderms und um die Chorda in dem hier berücksichtigten Untersuchungszeitraum eine ausgeprägte Basalmembranbildung.

Die hier besprochenen mesodermalen Gewebe, die Einzelzellen aus dem Gewebsverband entlassen, zeigten jedoch keine Basalmembranabgrenzung.

Diese Befunde lassen deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit folgenden Schluß zu: Die Basalmembranbildung muß in irgendeiner Weise von den epithelialen Geweben gesteuert werden, da mesenchymale Grundsubstanz-bildende Zellen überall vorkommen. Der Syntheseort der Basalmembran ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es werden sowohl eine mesenchymale als auch eine epitheliale Beteiligung diskutiert. Da aber ein großer Teil der Basalmembran aus Kollagen und Mucopolysaccharidkomplexen besteht, muß der Syntheseort zumindest dieser Substanz in das Mesenchym verlegt werden. Zweifellos beteiligen sich aber auch noch die Epithelzellen ebenfalls an diesem Vorgang. Di Quantität dieser Beteiligung dürfte zwar relativ gering, aber wie unsere Befunde zeigen, nicht weniger wichtig sein. Sie bestimmt vielleicht die Lokalisation dieser Struktur. Die Aggregation und Polymerisation der Basalmembran dürfte zwar an jeder Stelle des embryonalen Organismus möglich sein, das Ausbleiben jedoch dieser Verdichtung unterhalb der mesodermalen Struktur ist auf das Fehlen einer noch nicht genau definierten Substanz zurückzuführen, die die Polymerisation gerade an dieser Stelle prägen.

Die aus der mesodermalen Epithellamelle, dem Myotom, freigesetzten Zellen müssen als Vorläufer der

Skelettmuskulatur angesehen werden. Sicher ist, daß viele dieser Zellen den Weg wandernd zurücklegen müssen. Unbekannt jedoch ist, ob und wie oft sie sich teilen müssen,bis sie mit der Myofilamentbildung beginnen können. Genaue Untersuchungen über das Auftreten von kontraktilen Proteinen während der Entwicklung dieser Zellen bei Säugetieren fehlen noch.

Nach unseren eigenen Erfahrungen (SCHÜSSLER, 1971) muß diese Entwicklung von der Myotomzelle zur fertigen mehrkernigen Muskelfaser im Stammbereich auf Grund morphologisch-elektronenmikroskopischer Kriterien in verschiedene Stadien eingeteilt werden:

1. Die noch sicher undifferenzierte Stammzelle im Myotomverband.
2. Die Zellen, die zwar für eine weitere Differenzierung in Richtung Skelettmuskelzelle programmiert sind, aber noch keine kontraktilen Proteine synthetisieren, die sogenannten myogenen Zellen.
3. Zellen, die bereits ungeordnet kontraktile Proteine enthalten, die aber noch einkernig sind, die sogenannten Myoblasten.
4. Die mehrkernigen typisch quergestreiften Skelettmuskelfasern, die Myotubes.

Bei der Entwicklung für die Muskulatur im Extremitätenbereich muß zwischen Punkt 1 und 2 noch das Stadium der wandernden Zellen eingeschoben werden, deren genaue morphologische Definition im Moment noch schwer fällt. Sie sehen zu diesem Zeitpunkt typischen Mesenchymzellen sehr ähnlich.

Versucht man diese Einteilung auf die aus dem Myotomverband freiwerdenden Zellen bzw. auf die noch in der Nähe der Axialorgane liegenden Zellen anzuwenden, so gehören sie deutlich in die Gruppe 2, d.h. sie sind als myogene Zellen zu bezeichnen. Sie sind noch einkernig und enthalten noch keine fädigen kontraktilen Proteine. In diesem Stadium lassen sie sich elektronenmikroskopisch nicht auf Grund ihrer prospektiven Differenzierungsrichtung charakterisieren. Allein die äußere Zellform scheint sie etwas von den übrigen ortsständigen Mesenchymzellen abzuheben. Sie sind rund und weisen plumpe Fortsätze auf. Diese Form ist wahrscheinlich jedoch nicht Ausdruck einer besonderen Differenzierungsrichtung, sondern eher Folge der motorischen Aktivität, die schließlich zur Anordnung dieser Zellen zwischen den Segmenten führt.

Bei manchen anderen Zelltypen, denen ebenfalls eine Beweglichkeit zugeschrieben wird, finden sich ähnliche plumpe Fortsätze (v.KEYSERLINGK, 1971; WOHLFAHRT-

BOTTERMANN, 1968). Wir möchten deshalb postulieren, daß die prospektive Potenz einer Zelle und eine bereits im Kern programmierte Differenzierungsrichtung sich so lange auch elektronenmikroskopisch noch nicht erfassen läßt, bis sie im Cytoplasma durch die Synthese von Makromolekülen und ihre Verknüpfung zu größeren Strukturen (Myofibrillen und Membransysteme) sichtbar werden.

Auf die Unmöglichkeit, aus der Ribosomen- bzw. Polysomenstruktur auf das Proteinsyntheseprodukt schließen zu können, wurde bereits oben hingewiesen.

Da aber in dem von uns berücksichtigten Untersuchungszeitraum ein Auftreten von Myofilamentmakromolekülen nicht nachweisbar ist, muß die Möglichkeit, die prospektive Potenz einer Zelle morphologisch zu erfassen, verneint werden.

Das relativ späte Einsetzen der Myofilamentbildung könnte hypothetisch erklärt werden mit dem Fehlen eines Stützgerüstes, das die Muskelbildung induziert, Spannungskräfte ermöglichkt und Fixpunkte schafft.

Diese Überlegung kann in vivo durchaus zutreffen. In vitro Untersuchungen jedoch zeigen eine Ausdifferenzierung ohne Vorhandensein solcher Faktoren. Allerdings darf der Einfluß der festen Unterlage und

die adhäsiven Eigenschaften der Zelle in der Kultur zu diesem Zusammenhang nicht vergessen werden.

Wenn sich die myogenen Zellen zu Myoblasten differenzieren ohne mechanischen Einfluß, müßten genetische Faktoren, d.h. genuin ablaufende Reifungsvorgänge gefordert werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die von uns untersuchten Rattenembryonen vom Wista Stamm FW Paderborn 68 entstammen den Tagen 9 + 2 bis 12 + 2.

Nach Fixierung in Karnovsky-Lösung und OSO_4 erfolgte die Einbettung im Mikropal.

Die zu untersuchenden Stellen wurden lichtmikroskopisch mit sogenannten Semi-Dickschnitten ausgewählt und dann für die Elektronenmikroskopie mit Ultrotomem geschnitten.

Die eigentliche embryolnale Entwicklung läßt sich erst vom Tage 8 an morphologisch verfolgen. Die ersten Somiten sind am späten Tag 9 im cranialen Bereich zu erfassen. Die elektronenmikroskopische Beschreibung der Somitenauflösung bezieht sich auf die Tage 10 bis 12.

Der vollentwickelte Somit besteht aus einer einschichtigen Lage polar aufgebauter Zellen, die einen runden bis ovalen Hohlraum umgeben. Mit der Somitenauflösung geht die Polarisierung der Zellen und die besonderen Kontaktverhältnisse verloren. Es bleibt nur noch eine halbmondförmige Epithellamelle stehen, der ursprüngliche Hohlraum ist mit mesenchymähnlichen Zellen angefüllt.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung tropfen an den Enden des verbliebenen Somitenepithelverbandes (Myotom) Zellen ab. Sie formen sich zu den frühesten myogenen Zellen um, die sich morphologisch durch ihre runde Form mit plumpem Fortsatz von den übrigen Zellgruppen unterscheiden lassen. Sie enthalten noch keine Myofilamente. Die weitere Entwicklung wird charakterisiert durch die Vermehrung und Wanderung der myogenen Zellen. Ein morphologisches Substrat der prospektiven Bedeutung kann auch elektronenmikroskopisch nicht gefunden werden.

Die eigentliche Differenzierung im Myoblasten tritt wahrscheinlich in Abhängigkeit zur Reifung des Wirbelsäulensystems erst relativ spät ein und wurde deshalb hier nicht weiter beschrieben.

B I L D M A T E R I A L

Abb. 1) Rattenembryo Tag 10.

Früher Somit mit noch kleinem Myocoel (MC), unscharfer Abgrenzung des Coelomepithelverbandes (C) zum Mesenchym (M) hin, weiten Interzellularräumen zwischen Coelomepithel (IC) und Mesenchymzellen (IM), Kerne (N) vorwiegend im basalen Bereich lokalisiert, im apikalen Bereich bereits bei dieser geringen Vergrößerung Kontaktstellen (↙) sichtbar.
Vergrößerung 1:7000

M
N
N
MC
IM

Abb. 2) Rattenembryo Tag 10.

Zusammenbruch des epithelialen Somitenverbandes, von der Klammer (M) in Richtung nach oben die etwas ungeordnete Myotomplatte. Links davon das sich auflösende Dermatom und Sklerotom.
N = Kerne, Mi = Zelle in Mitose,
No = Nucleolus, I = Interzellularräume.
Vergrößerung 1: 7000

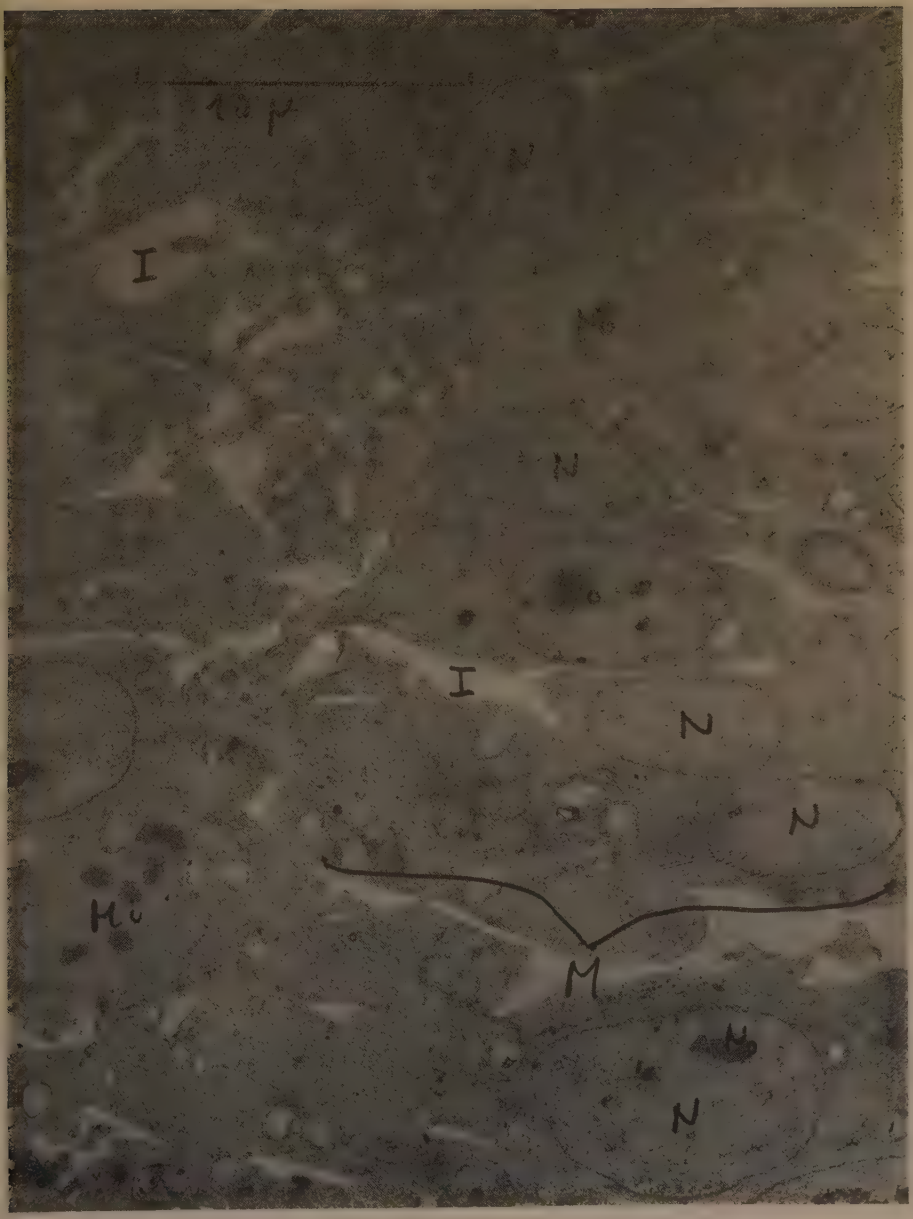
10 μ
I
I
N
N
N
M
M
N

Abb. 3) Rattenembryo Tag 11.

Randbereich des noch epithelial aufgebauten Myotoms (M) und die Zellen des sich bereits völlig aufgelösten Dermatoms und Sklerotoms mit den Kennzeichen von Mesenchymzellen (MZ). I = Interzellularräume.
Vergrößerung 1 : 7000

Mz
Mz
Mz
Mz
I
I
I
I
M

Abb. 4) Rattenembryo Tag 11.

Typisches Myotom (M) mit einer Platte geschichteter Zellen in engem Kontakt (↙). In der Umgebung Mesenchymzellen (MZ) mit zahlreichen Fortsätzen, dazwischen weite Interzellularräume (I).
N = Kern, No = Nucleolus.
Vergrößerung 1:7000

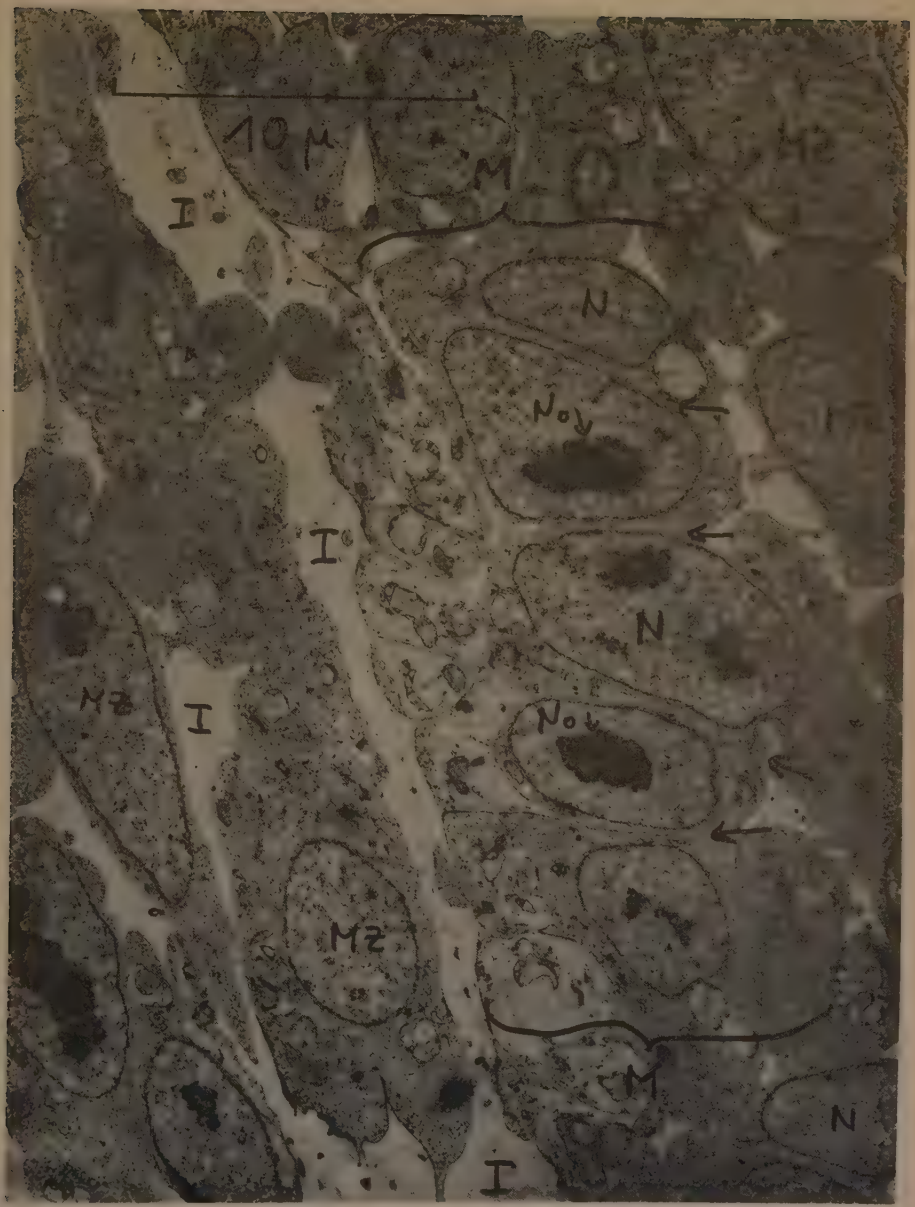
10 µ
M
I
N
Nol
I
N
Mz
I
Nol
Mz
M
N
I

Abb. 5) Rattenembryo Tag 11.

Ähnlicher Ausschnitt wie Abb. 4 in höherer Vergrößerung. Zellen des Myotoms (N) mit breiten Kontaktflächen untereinander (↙).

M = Mesenchymzellen der Umgebung

I = Interzellularräume

Vergrößerung 1:21000

M
M
N
N
N
I
I
M
I

Abb. 6) Rattenembryo Tag 12.

Endabschnitt eines Myotoms mit einem noch zusammenhängenden, aber bereits schon aufgelockerten Verband aus plumpen Zellen.
N = Kern, No = Nucleolus,
O = freie Polysomen, Mi = Mitochondrien,
I = Interzellularraum.
Vergrößerung 1:20000

M
I
I
Hi
N
N
Hi
N
O
O
N
I
Hi
Hi
O
Hi

Abb. 7) Rattenembryo Tag 12.

Myogene Zellen in der Umgebung eines Myotoms, charakterisiert durch große, aufgelockerte Kerne (N) mit großem Nucleolus (No), wenig Zellorganellen (z.B. Mitochondrien = Mi) und vielen freien Ribosomen. Typische im Längsschnitt und im Querschnitt (✱).
I = Interzellularraum
Vergrößerung 1:10000

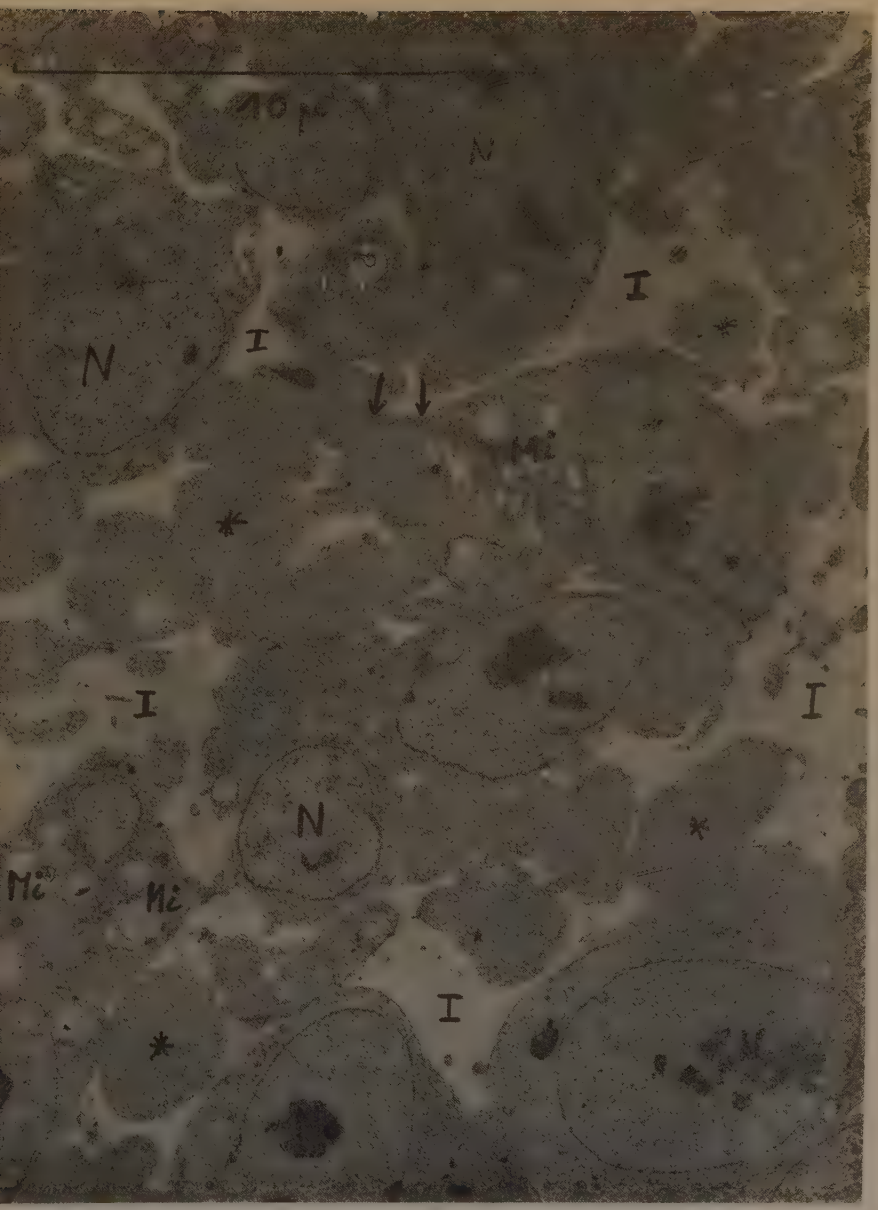
10μ
N
I
N
I
Mi
I
I
N
Mi
Mi
I

Abb. 8) Rattenembryo Tag 12.

Dicht gepackte Zellen eines Muskelblastems im paravertebralen Bereich. Die bereits gestreckten Zellen sind im Querschnitt getroffen, deshalb zahlreiche Anschnitte ohne Kerne (N).
I = Interzellularraum
Bei N+ ein Kern in der Prophase
Vergrößerung 1:7000

10μ
N
I
N
N
N
N
I
I
N
I
N
N
N
N
N
I
N
I
N

L I T E R A T U R

BALFOUR, F.M.: A Treatise on Comparative Embryology Vol.II: Vertebrata. Macmillan, London, 1885

BEERMANN, W.: Cytologische Aspekte der Informationsübertragung von Chromosomen in das Cytoplasma. in: Induktion und Morphogenese. 13.Coll. physiol. chem. Springer Verlag 1963, S. 64-100

BENEDETTI, E.L., and P.EMMELOTT: Hexagonal array of subunits in tight functions separated from isolated rat liver plasma membranes. J.Cell Biol. 38, 15-24, 1968

BIRBECK, M.C., and E.H. MERCER: Cytology of cells which synthezise Protein. Nature 189, 558, 1961

v.BRUCHHAUSEN, F. und H.J. MERKER: Gewinnung und morphologische Charakterisierung einer Basalmembranfraktion aus der Nierenrinde der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Archiv 251, 1-12, 1965

BUTCHER, E.O.: The development of the somites in the white rat and the fate of the myotomes, neural tube and gut in the tail. Am.J.Anat. 44, 381-'39, 1929

CLARA, M.: Entwicklungsgeschichte des Menschen. Edition Leipzig, Leipzig 1966

DANON, D.: Reifung der Blutkörperchen. Vortrag vor dem Sonderforschungsbereich 29, 1969

DEXTER, S.: The somites and coelom in the chick. Anat. Anz. Bd. 6, 284-289, 1891

FARQUHAR, M. G., and G.E.PALADE: Functional complexes in various epithelia. J.Cell Biol.17, 375-412, 1963

FLICKINGER, R.A.: Sequential gen-action in protein-synthesis and cellular differentiation. Internat. Rev. Cytol., 13, 75-98, 1962

GRUNEBERG, H.: Normal staging of the Mouse Embryo. J. Heredity, 34, 89-92, 1943

HAMILTON, L.: The formation of somites in Xenopus. J.Embryol. exp. Morph., 22, 253-264, 1969

HIRSCH, G.W., and L.HAMILTON: The developmental fate of the first somite of the chick. Anat. Rec., 125(2), 225-238, 1956

v.KEYSERLINCK, D.: Ultrastruktur des Myometriums der Ratte in den verschiedenen funktionellen Stadien. Habilitationsschrift FU Berlin 1971

LANGMAN, J.L.: Medizinische Embryologie.
Thieme Verlag Stuttgart, 1970

LOEWENSTEIN, N.R.: Intercellular connections.
Ann. N.Y.Acad.Sci., 137, 441-453, 1966

MASSHOFF, W.: Entwicklung und Wachstum.
Handb. Allg.Pathol., Bd.6/I, S.441-504
Springer Verlag 1955

Mc NUTT, N.S., and R.S.WEINSTEIN: The ultrastructure of the nexus.
A correlated thin-section and freeze-cleave study.
J.Cell Biol., 47, 666-688, 1970

MERKER, H.J.: Über den Aufbau der Zellmembran.
Berliner Medizin, 15, 595-607, 1964

Elektronenmikroskopische Morphologie der intestinalen Resorption.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol., 53, 57-79, 1969

In: Einführung in die Elektronenmikroskopie.
Thieme Verlag Stuttgart, 1971, in Druck

OTIS, E.M., and R.C.BRENT: Equivalent ages in mouse and human embryos.
Anat. Rec., 120, 33-64, 1950

PFEIFFER, S.: Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Bildung des Somiten und der Coelomhöhle bei Rattenembryonen.
Dissertationsschrift FU Berlin, 1972

REINIUS, Morphology of the mouse embryo, from the time of implantation to mesoderm-formation.
Z. Zellforschung, 68, 711-723, 1965

REVEL, J.P., and M.J.KARNOVSKY: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.
J. Cell Biol., 33, C 7, 1967

SHERIDAN, J.D.: Electrophysiological study of special connections between cells in the early chick embryo.
J. Cell Biol., 31, C 1 - C 5, 1966

SCHÜSSLER, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Muskelentwicklung in der hinteren Extremität von Hühner embryonen
Dissertationsschrift FU Berlin, 1971

SNELL, G.D.: The early embryology of the mouse.
In: Biology of the laboratora mouse, G.D.Snell (Ed.), Philadelphia 1941

SOBOTTA, J.: Die Entwicklung des Eies der Maus vom ersten Auftreten des Mesoderms an bis zur Ausbildung der Embryonalanlage.
Arch. Mikr. Anat., 78, 271-352, 1911

STARCK, D.: Embryologie.
Thieme Verlag Stuttgart, 1965

VOLLRATH, L. Über Bau und Funktion von Basalmembranen.
Dtsch. med. Wochr., 93, 360-369, 1968

WESSELLS, N.K.: DNA synthesis, mitosis, and differentiation in pancreatic acinar cells in vitro.
J. Cell Biol., 20, 415-433, 1964

WILLIAMS, L.W.: The somites of the chick.
Am. J. Anat., 11, 55-99, 1910

WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Die Dynamik der Zelle.
Mikroskopie, 23, 71-96, 1968

Herrn Prof. Dr. med. H.J. Merker danke ich für die Überlassung des Themas

"Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Auflösung der Somiten bei Rattenembryonen"

L E B E N S L A U F

25.8.1943	Ulrike, Angelika Faber, geboren als 5. Kind des Juristen Otto Faber und seiner Ehefrau Helene, geb. Meissner.
1950-54	Evang. Grundschule, Düsseldorf
1954-63	Goethe-Schule, altsprachlicher Zweig, Düsseldorf
März 1963	Abitur Düsseldorf
1963-64	Leibniz-Kolleg der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1964-71	Medizinstudium an der FU Berlin
März 1971	Staatsexamen
1971-72	Medizinalassistentenzeit (Städt.Krankenhaus Neukölln, St. Gertrauden Krankenhaus, Klinikum Steglitz)

Druck:
Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -
1 Berlin 41, Kelchstraße 31